

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number : **04-005287**  
 (43) Date of publication of application : **09.01.1992**

(51) Int.CI.

C07D401/06  
 C07D401/12  
 C07D403/06  
 C07D403/12  
 C07D405/06  
 C07D405/12  
 C07D413/06  
 C07D413/12  
 C07D471/04  
 C07D491/056  
 G01N 31/22

(21) Application number : **02-105046** (71) Applicant : **BIO SENSOR KENKYUSHO:KK**  
 (22) Date of filing : **20.04.1990** (72) Inventor : **YAMADA SACHIKO  
SHIMIZU MASATO**

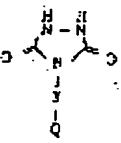
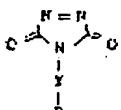
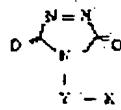
#### **(54) REAGENT FOR DETERMINING VITAMIN DS AND PRODUCTION THEREOF**

##### **(57) Abstract:**

**NEW MATERIAL:** A compound shown by formula I (X is fluorescent coloring group or potentially chemical luminous group; Y is spacer).

**USE:** For detecting and determining vitamin D, vitamin A and a metabolite thereof.

**PREPARATION:** A compound shown by formula II or formula III (Q is hydroxymethyl or amino) is coupled with a compound shown by the formula X-COC1.



#### **LEGAL STATUS**

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision  
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C) 1998,2003 Japan Patent Office

## (2) 公開特許公報 (A) 平4-5287

(5) Int. Cl. 5

C 07 D 401/06  
401/12  
403/06

識別記号

庁内整理番号

(3) 公開 平成4年(1992)1月9日

8213-4C  
8213-4C  
8213-4C※

審査請求 未請求 請求項の数 9 (全26頁)

(2) 発明の名称 ビタミンD類定量用試薬およびその製法

(2) 特 願 平2-105046

(2) 出 願 平2(1990)4月20日

(2) 発明者 山田 幸子 東京都八王子市初沢町1227-4 高尾パークハイツA-1218

(2) 発明者 清水 正人 東京都品川区大井1-34-4 早川ハイツ3号

(2) 出願人 株式会社バイオセンサ 東京都豊島区高田3丁目41番8号  
一研究所

(2) 代理人 弁理士 湯浅 恒三 外4名

最終頁に続く

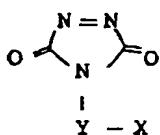
## 明細書

## 1. [発明の名称]

ビタミンD類定量用試薬およびその製法

## 2. [特許請求の範囲]

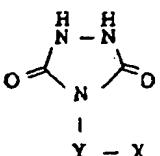
## 1. 一般式(I)



(式中、Xは蛍光発色基またはポテンシャル化  
学発光基を示し、Yはスペーサーを示す)

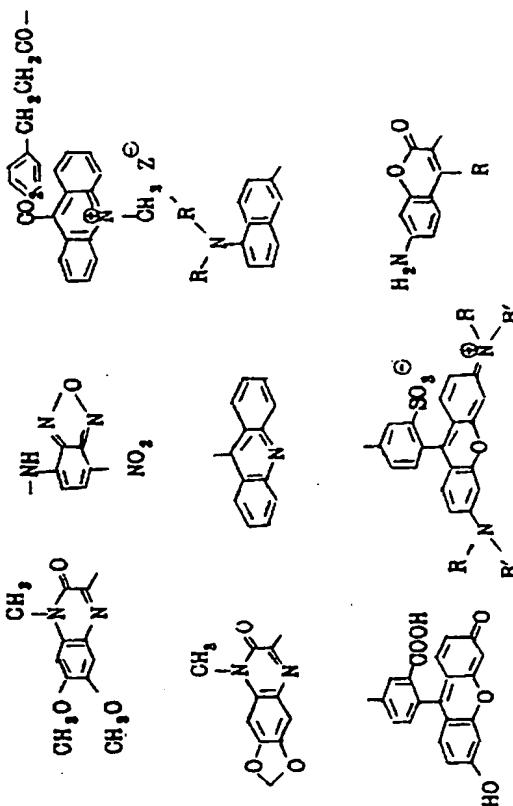
で表される化合物。

## 2. 一般式(II)



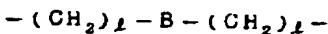
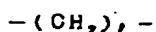
(式中、Xは蛍光発色基またはポテンシャル化  
学発光基を示し、Yはスペーサーを示す)

で表される化合物。



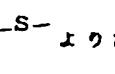
(2) (式中、Zは該の共役基を示し、RおよびR'は同一でも異なるてもよく、水素原子またはアルキル基を示す)

で示される基よりなる群から選ばれた一員であり、Yが下記式



(式中-A-は-O-または-NH-を示し；

-B-は、-NH-, -COO-, -SO<sub>2</sub>NH-,

-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>-および  よりなる群から選ばれた一員を示し。

Lは1から5までの整数を示し。

Mは0から5までの整数を示し。

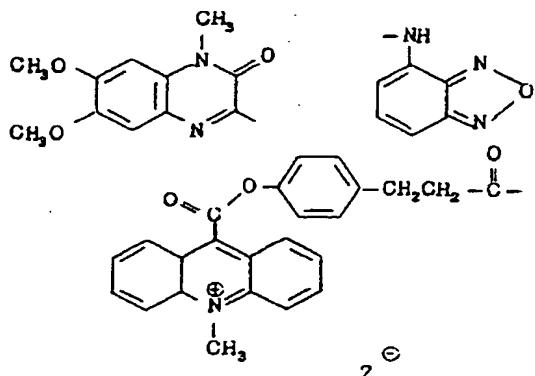
Nは0または1のいずれかを示す)

で示される基よりなる群から選ばれた一員である

(但し、Yのそれぞれの式の左端は該の塩素原子と右端はXと結合する)。

請求項1または2に記載の化合物。

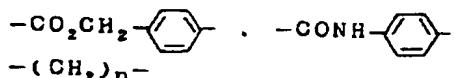
4. Xが下記式



(式中Zは該の共役基を示す)

で示される基よりなる群から選ばれた一員であり、

Yが下記式



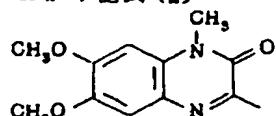
(式中Nは0または1のいずれかを示す)

で示される基よりなる群から選ばれた一員である

(但し、Yのそれぞれの式の左端は該の塩素原子と、右端はXと結合する)。

請求項3に記載の化合物。

5. Xが下記式(I)



(I)

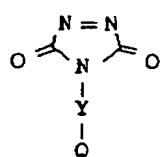
およびYが下記式(IV)



(IV)

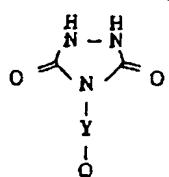
で示される基である。請求項3に記載の化合物。

6. 一般式(V)



(V)

または(IV)



(IV)

(式中、Yはスペーサーを示す)。

Qはヒドロキシメチル基またはアミノ基を示す) (3)

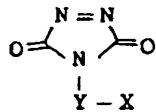
で表される化合物を一般式 (IV)



(IV)

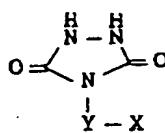
(式中、Xは蛍光発色団またはポテンシャル化  
学発光基を示す)

で表される化合物とカップリングすることを特徴  
とする一般式 (I)



(I)

(式中、XおよびYは前記の意味を有する)  
または一般式 (II)

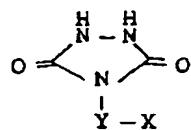


(II)

(式中、XおよびYは前記の意味を有する)  
で表される化合物の製造方法。

#### 7. 一般式 (V)

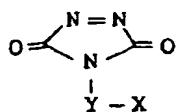
または一般式 (B)



(B)

(式中、XおよびYは前記の意味を有する)  
で表される化合物を蛍光もしくは化学発光試薬と  
して用いることを特徴とする。化学構造中にcis  
-ジエン構造を持つ化合物の検出および定量分析  
法。

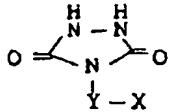
#### 8. 一般式 (I)



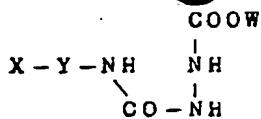
(I)

(式中、Xは蛍光発色団またはポテンシャル化  
学発光基を示し、Yはスペーサーを示す)

または一般式 (II)



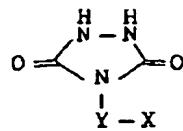
(II)



(VI)

(式中、Xは蛍光発色団またはポテンシャル化  
学発光基を示し、Yはスペーサーを示し、Wは  
 $C_1-C_5$ アルキル基を示す)

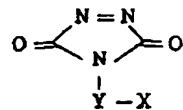
で表されるセミカルバジド体を閉環することを特  
徴とする一般式 II



(II)

(式中、XおよびYは前記の意味を有する)  
で表される化合物の製造方法。

#### 8. 一般式 (I)



(I)

(式中、Xは蛍光発色団またはポテンシャル化  
学発光基を示し、Yはスペーサーを示す)

(式中、XおよびYは前記の意味を有する)  
で表される化合物を蛍光もしくは化学発光試薬と  
して用いることを特徴とする。ビタミンD、ビタ  
ミンAまたはこれらの代謝物の検出および定量分  
析法。

#### 3. [発明の詳細な説明]

##### 産業上の利用分野

本発明は蛍光性発色団あるいは化学発光能を有  
する官能基を持つオジエン試薬とその製法に関する  
。更にはその試薬を用いての cis-ジエンを持  
つ化合物、特にビタミンD、ビタミンAおよびそ  
れらの代謝物の検出、定量分析法に関する。

##### 従来の技術・発明が解決しようとする課題

活性ビタミンD<sub>3</sub>、代謝物の1 $\alpha$ 、25-ジヒド  
ロキシビタミンD<sub>3</sub>がカルシウム代謝のみならず  
標的細胞の様々なものの増殖や分化を調節する多  
くの機能を持ったステロイドホルモンであること  
は現在よく知られている。ビタミンDの生物学的  
役割を十分理解するために様々な臨床の場におけ  
るヒト血漿中の主要代謝物の濃度を正確に知るこ

とは重要なことである。

一般に使用されている統合的結合分析は特異性を欠くので、重要な代謝物は、分析に先立って分けられていなければならぬ。また、この分析法は正確さに欠ける。ガスクロマトグラフィー-質量分析法は確定的操作が煩雑であるなどの問題がある。

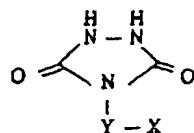
従ってビタミンD代謝物を分析するための正確で特異的かつ高感度の方法が必要とされていた。

#### 課題を解決するための手段

本発明者は、ビタミンD、ビタミンAまたはそれらの代謝物の共役したトリエンの部分と遙く特異的かつ定量的に反応する新規な、蛍光もしくは化学発光試薬(I)および(II)を合成した。

本発明の化合物は下記一式(I)および(II)で示される。

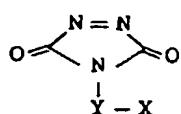
(4)



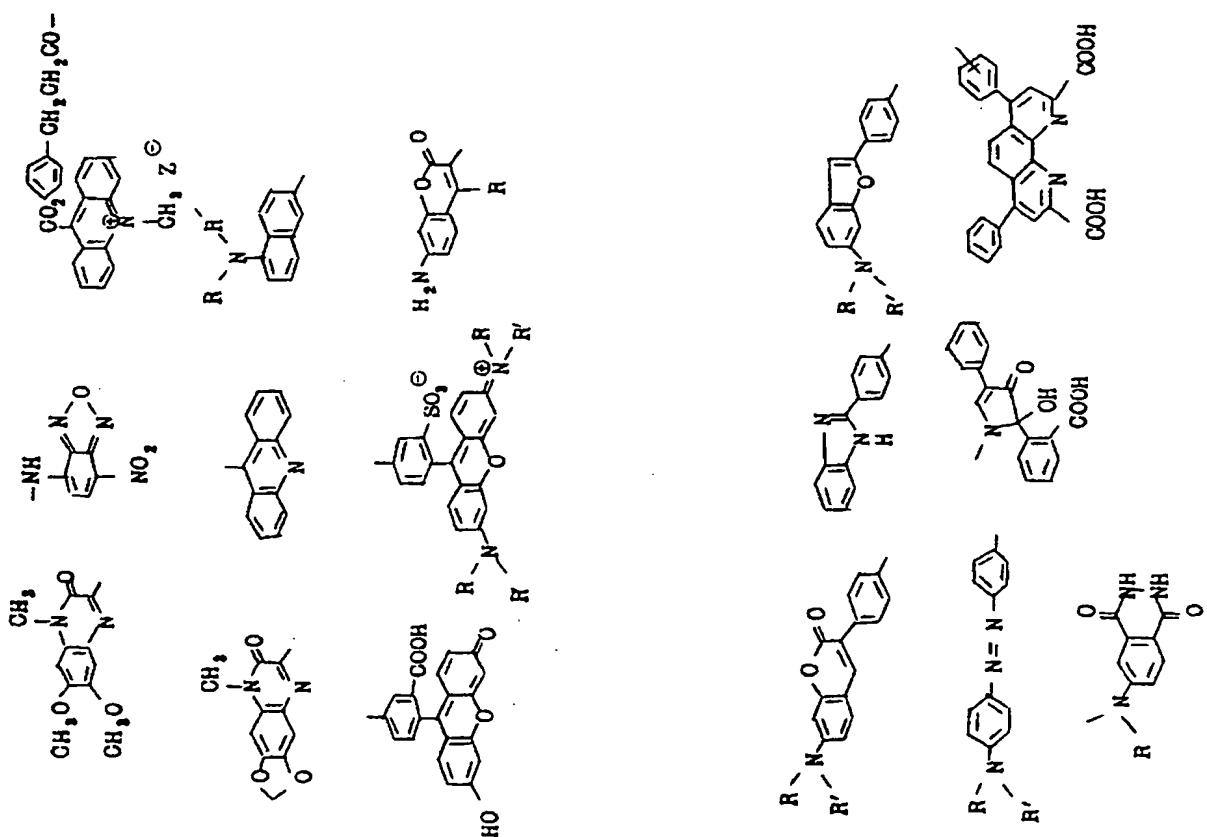
(I)

各式中、Xは蛍光発色基またはホテンシャル化学発光基であり、Yはスペーサーである。

Xの例としては下記式



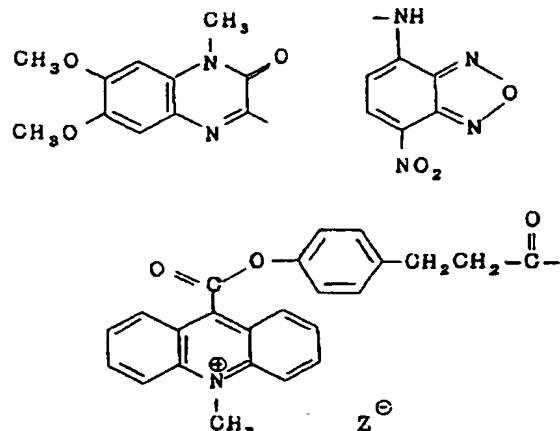
(II)



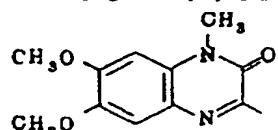
(5)

(式中 Z は酸の共役塩基を示し:  
R および R' は同一でも異なるあっててもよく。  
水素原子またはアルキル基を示す)  
で示されるものが挙げられる。

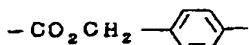
X の好ましい例としては下記式



(式中 Z は前記と同じ意味を示す)  
で示されるものが挙げられる。式

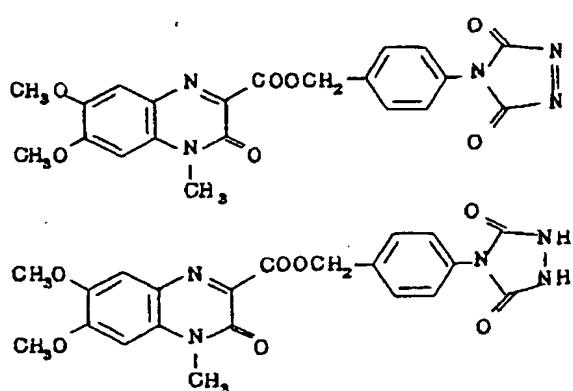


(但し R は前記と同じ意味を示す) で示されるものが挙げられる。式



である場合が特に好ましい。

本発明の化合物の好ましい例としては、式

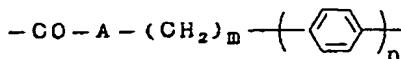


で表されるものが挙げられる。

本発明の一式式(I)および(I')で示される化合物は、  
以下の様にして合成される。

である場合が特に好ましい。

一方、Y の例としては下記式

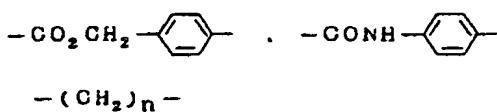


(式中、-A- は -O- または -NH- を示し、  
-B- は -NH- 、 -COO- 、 -SO2NH- 、  
-Phenyl- および よりなる時より

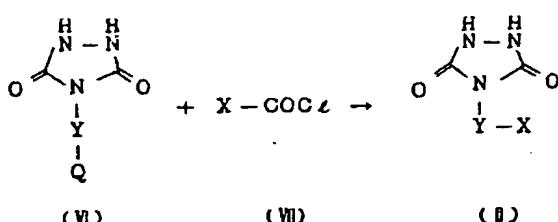
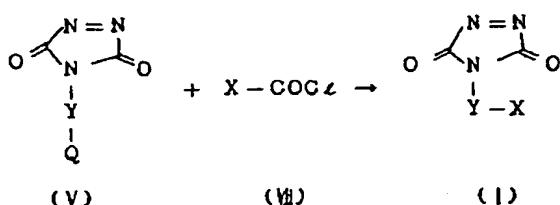
選ばれた一員を示し、z は 1 から 5 までの整数  
を示し、m は 0 から 5 までの整数を示し、n は  
0 または 1 のいずれかを示す)

で示されるものが挙げられる。但し Y のそれぞれ  
の式の左端は一般式(I)または(I')の他の置換原子と、  
右端は X と結合する。

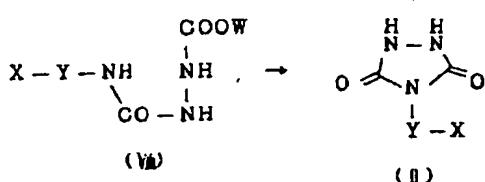
Y の好ましい例としては下記式



A) トリアゾリジンシントンと発色団シントンと  
のカップリングによる方法。



B) セミカルバジド体を最後に閉環する方法。



(式中、X および Y は前記と同じ意味を示す)。

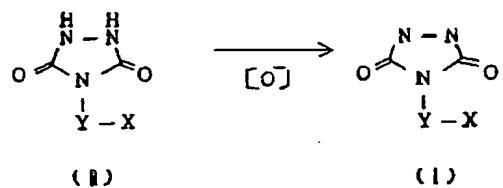
(6) Qはヒドロキシメチル基またはアミノ基を示し。

WはC<sub>1</sub>—C<sub>3</sub>アルキル基を示す)

A) 法として一般式(V)と(VII)から(I)を得る反応または一般式(VI)と(VII)から(II)を得る反応は、酸クロリド体(IV)を無水ベンゼン等の溶媒に溶解し、(V)または(VI)の無水DMF溶液を加え、過剰することによって行う。

B) 法として一般式(Ⅴ)から(Ⅵ)を得る反応は、無水炭酸カリウム等の共存下(Ⅶ)を無水エタノール等の溶媒に懸濁し、過流することによって行う。

また、試薬(1)が不安定な場合、下記反応式のように(1)より用時調製する。



一般式(I)から(I')を得る反応は、 $Pb(OAc)_4$ 、 $PhI(OAc)_2$  等の強烈な酸化剤で酸化することにより行う。

融点は、微量融点測定器（柳本製作所製）にて測定し、未補正。IRスペクトルは、日本分光FT/IR-7000型にて測定。MSスペクトルは、日本電子JMS-D300型にて電子衝撃法(EI)あるいは、日立M-2000型にてSIMS法にて測定。<sup>1</sup>H-NMRスペクトルは、日本電子GX-270型にて測定し、tetramethylsilaneを内部標準として、化学シフトをδ値で示した。測定溶媒は、各化合物ごとに記した。なおD<sub>2</sub>O中での測定には、3-(trimethylsilyl)-propionic acid-d<sub>4</sub> sodium saltを内部標準に用いた。NMRの記載は、次の略号によった。s=singlet; d=doublet; t=triplet; q=quartet; m=multiplet; arom=aromatic; br=broad; sig=signal。TLC(薄層クロマトグラフィー)は、Kiesel gel GF<sub>254</sub>(Merck社製)を使用。カラムクロマトグラフィーは、特配しない限り、シリカゲルは、Merck社製Kiesel gel 60(35-70 mesh)を使用。反応は、ルーティンにアルゴン気流下で行なった。

### 作用

本発明の一式式(Ⅰ)および(Ⅱ)で示される化合物は、ビタミンD、ビタミンAおよびそれらの代謝物のcis-ジエンの部分を特異的に檢知する強光の強い赤ジエン試薬である。

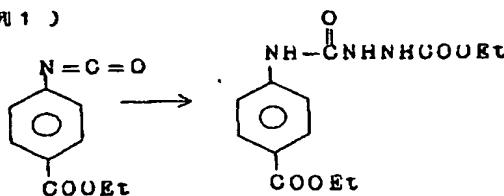
求ジエングループとして選ばれた4-置換-1,2,4-トリアゾリン-3,5-ジオンは反応性が高く、緩和な条件下で少量の基質と定量的に反応する。また対称であるので1種の幾何異性体しかできないという利点を持つ。

螢光発色団またはポテンシャル化学発光基として選ばれたXで示される基は、高い発光効率を持っており、またこれらはトリアゾリジン環の酸化条件下でも安定である。

以下に本発明を製造例及び実験例によって更に詳しく述べるが、本発明はこれらの製造例及び実験例によって何ら限定されない。

## 製造例及び実施例

(製造例1)



エチル4-イソシアナトベンゾエイト(5.0g・  
0.026 mol)の無水ベンゼン溶液(260ml)  
中に、室温攪拌下カルバジン酸エチル(3.4g・  
0.033 mol)を加えた後、反応混合物を2時間  
加熱煮沸した。室温に戻した後、析出結晶を吸引  
が取り、粗セミカルバジト<sub>1</sub>(7.25g、収率  
93.9%)を得た。本品をEtOHより再結晶し。  
無色鱗片状晶(6.80g)を得た。

### 化合物 1：

MP 194-195°C

MS m/z 88: 295 (M<sup>+</sup>, 6), 250 (7), 204 (5).

146(65), 104(100).

IR  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3308 (NH), 1707 及び

1673 (C=0)

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub> + DMSO-d<sub>6</sub>) δ :

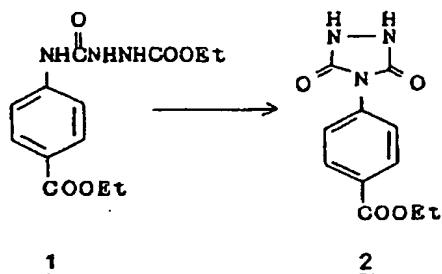
128 (3H, t, J=7.3Hz, CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> )	(7)
138 (3H, t, J=7.3Hz, CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> )	
4.19 (2H, q, J=7.3Hz, CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> )	
4.33 (2H, q, J=7.3Hz, CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> )	
7.52 及び 7.92	
(4H, AA'BB', J=8.6Hz, aromH)	
7.70 (1H, br, sig, NH)	
7.80 (1H, br, sig, NH)	
8.57 (1H, br, sig, NH)	

元素分析：計算値

(C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>) : C. 52.87; H. 5.80; N. 14.23

測定値 : C. 52.71; H. 5.72; N. 14.14

## &lt; 製造例 2 )



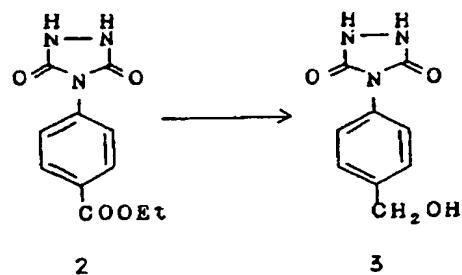
1.40 (3H, t, J=7.3Hz, CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> )
4.37 (2H, q, J=7.3Hz, CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> )
7.71 及び 8.10 (4H, AA'BB', J=8.6Hz, aromH)
10.29 (2H, br, s, 2×NH)

元素分析：計算値

(C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) : C. 53.03; H. 4.45; N. 16.86

測定値 : C. 53.00; H. 4.51; N. 16.95

## &lt; 製造例 3 )



## &lt; 方法 1 &gt;

エステル体 2 (355mg, 1.43mmol) の無水 THF (8.5ml) 溶液をドライアイス及び四塩化炭素浴を用いて -20°C に冷却し、本冷却・攪拌

セミカルバジド 1 (1181g, 4mmol) を無水 EtOH (50ml) に溶解し、粉砕した無水炭酸カリウム (553mg, 4mmol) を加えた様、反応液を 5 時間加熱還流した。減圧下 EtOH を留去し、残渣に水冷却を加え、さらに希塩酸を用いて水層を酸性とした。水層は、AcOEt (3 × 60ml) にて抽出し、AcOEt 層は、飽和食塩水にて洗浄、無水硫酸マグネシウムにて乾燥し、粗雑留去した。結晶性残渣 (901mg) は、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (45g) にて精製し、10% MeOH 含有 AcOEt 抽出部よりトライアゾリジン 2 (808mg, 収率 81.1%) を結晶状に得。AcOEt より再結晶し無色針状品を得た。

## 化合物 2

mp 206~207°C

MS m/z(%): 249 (M<sup>+</sup>, 35), 221 (31),

204 (100), 191 (13),

163 (21), 146 (72).

IR ν<sub>max</sub> cm<sup>-1</sup>: 1723 及び 1688 (C=O)<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub> + DMSO-d<sub>6</sub>) δ:

拌混液に水素化ジイソブチルアルミニウム (642mg; 1mmol/エトルエン溶液) を約 20 分間にわたって滴加した。反応混合液は、更に -20°C にて 4 時間搅拌した後、希塩酸 (2ml, 1.93mmol の塩酸水素を含む) を加えて酸性にした。減圧下溶媒を留去し得られた残渣を 2g のシリカゲルに吸着し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (40g) に付し精製した。カラムは、10% MeOH 含有 CHCl<sub>3</sub> にて抽出し、3 を含む分画を固体状 (337mg) に得。MeOH により結晶化させ、純粋なベンジルアルコール体 3 (240mg, 収率 81.4%) を無色針状品として得た。

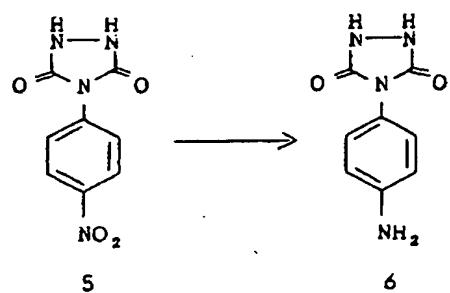
## &lt; 方法 2 &gt; ——スケールの大きい反応に適する——

エステル体 2 (1576g, 6.32mmol) を用いて、方法 1 と同様に反応・後処理を行なった。塩酸処理後の生成物を水 (60ml) にて懸濁させ、不溶物を粗雑留去した。汎液は、水にて充填した Amberlite XAD-2 カラム (700ml) にて通し、ベンジルアルコール体 3 を樹脂に吸着させた後、水 (1500ml) にてカラムを洗浄した。MeOH



294.370(1961)

## (製造例6)



ニトロ体5(787mg, 3.54mmol)のEtOH溶液(60ml)を、PtO<sub>2</sub>(80mg)存在下、常圧・常温にて水素氣流中接触還元を行なった。水素開始約40~50分後、反応容器内に結晶が析出し始めた。2時間後に理論水素消費量(240ml)に達したので反応を終了した。析出結晶は、AcOEt及びEtOHを用いて溶解させた後、セライトを通して吸引沪過した。沪液を減圧下溶媒留去すると粗アミノ体6(720mg、收率定量的)を結晶状に得た。本品は、EtOH-AcOEt(1:1; v/v)にて再結晶すると無色針状晶を与えた。

のセミカルバジド7(659g)を得た。結晶母液(2.24g)をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Wacogel C-200, 100g)にて精製し、2~5% MeOH含有CHCl<sub>3</sub>溶液よりさらに7(517mg)が得られた。合計收率は、76.0%であった。

化合物7: $\text{mp } 107.0\text{--}108.5^\circ\text{C}$ 

MS m/z(%): 225(M<sup>+</sup>+2, 0.08), 223(M<sup>+</sup>, 0.2), 178(2), 180(0.7), 141(16), 104(100).

IR  $\nu_{\text{max}} \text{cm}^{-1}$ : 3328(NH) $\text{^1H-NMR(CDCl}_3\text{)} \delta:$ 

129 (3H, t, J=6.9Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)  
200 (2H, m, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)  
3.39 (2H, m, -CH<sub>2</sub>NH-)  
3.59 (2H, t, J=5.8Hz, C<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-)  
4.21 (2H, q, J=6.9Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)  
5.68 (1H, m, NH)

(9) 化合物6: $\text{mp } > 300^\circ\text{C}$ MS m/z(%): 192(M<sup>+</sup>, 99), 134(100),

105(54), 79(24)

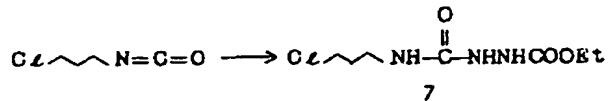
KBr IR  $\nu_{\text{max}} \text{cm}^{-1}$ : 1690(C=O) $\text{^1H-NMR(DMSO-d}_6\text{)} \delta:$ 5.21 (2H, br.s, NH<sub>2</sub>)

6.60 及び 6.97 (4H, AA' BB')

J=8.6Hz, arom H)

10.14 (2H, br.s, 2×NH)

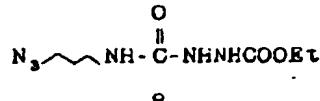
## (製造例7)



3-クロロプロピルイソシアネイト(5.0g, 41.8mmol)の無水ベンゼン溶液(120ml)にカルバジン酸エチル(5.2g, 50.2mmol)を加え、加熱還流1時間行なった。減圧下溶媒を留去すると粗生成物(9.25g)が結晶状に得られ。本品をAcOEt-Et<sub>2</sub>Oより再結晶し、純品

6.73 及び 6.81 (各々 1H, br.s, 2×NH)

## (製造例8)



セミカルバジド7(5.256g, 23.5mmol)の無水DMF溶液(55ml)にNaN<sub>3</sub>(183.0g, 28.2mmol)を加え、100℃にて3.5時間、加熱攪拌した。減圧下DMFを留去し、残渣に水(50ml)を加えて、AcOEt(5×70ml)にて抽出した。合一したAcOEt層は、冰洗、芒硝乾燥し、溶媒留去すれば、粗アジド体8(5.13g、收率94.8%)が結晶状に得られた。本品をエーテルより再結晶し、無色結晶(3.60g)を得た。

化合物8: $\text{mp } 81\text{--}82^\circ\text{C}$ MS m/z(%): no M<sup>+</sup>, 185(2), 141(3).

116(2), 104(100)

KBr IR  $\nu_{\text{max}}$  cm<sup>-1</sup>: 3260(NH)2102(N<sub>s</sub>)

1734 及び 1671(C=O)

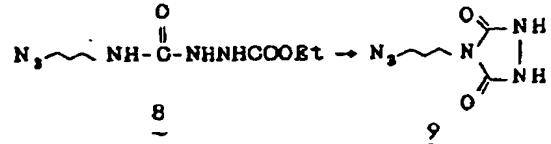
<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ:129 (3H, t, J=7.3Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)180 (2H, m, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)3.33 (2H, m, -CH<sub>2</sub>NH-)3.37 (2H, t, J=6.6Hz, N<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-)4.21 (2H, q, J=7.3Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)

5.64 (1H, m, NH)

6.66 及び 6.73 (各々 1H, br.s.

2×NH)

## (製造例9)



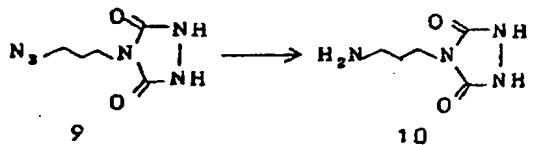
アジド体 8 (3.60g, 15.6 mmol)、粉砕した無水炭酸カリウム (2.60g, 18.7 mmol)

3.38 (2H, t, J=6.6Hz)

3.43 (2H, t, J=6.6Hz)

10.06 (2H, br.s, 2×NH)

## (製造例10)



アジド体 9 (17.0g, 9.23 mmol) を EtOH (19mL) 及び H<sub>2</sub>O (7.5mL) に溶解し、10% Pd-C (17.7mL) 存在下常圧水素接触還元に付した。減圧下9.6時間反応を行なった後、反応液は、セライトを通して触媒を除去した。沪液は、減圧下溶液留去すると結晶性残渣 (16.29g) が得られ、H<sub>2</sub>O-MeOHより再結晶すると遊離アミノ体 10 (10.07g, 収率 69.0%) が無色針状品として得られた。

化合物 10

mp 227~229°C

MS m/z(%): 158(M<sup>+</sup>, 100), 141(50).

(10) び無水 EtOH (140mL) の懸濁液を加熱還流3時間行なった。減圧下EtOHを留去し、残渣に水 (50mL) を加え、2N HClにて弱酸性とした。この酸性の水層は、あらかじめ水にて調整しておいた Amberlite XAD-2 カラム (450mL) を通した。カラムは水 (750mL) にて洗浄した後、MeOHにて、生成物を樹脂より脱着・溶出させた。合一した MeOH 溶出部を絶縁留去し、粗結晶生成物を得、このものを AcOEt より再結晶し、純品の 12 (2.58g, 収率 89.8%) を無色鱗片状品として得た。

化合物 12

mp 140~141°C

MS m/z(%): nom<sup>+</sup>, 141(20), 129(39).

101(100)

KBr IR  $\nu_{\text{max}}$  cm<sup>-1</sup>: 2100(N<sub>s</sub>)

1667(C=O)

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ:178 (2H, quinatet, J=6.6Hz,  
-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-)

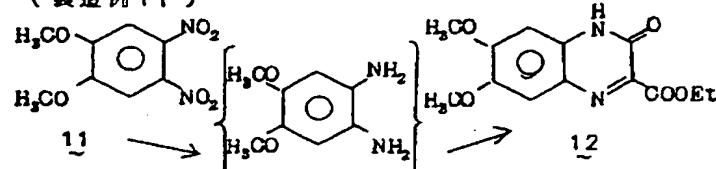
(36)

KBr IR  $\nu_{\text{max}}$  cm<sup>-1</sup>: 129(47), 101(95), 56(94).  
IR  $\nu_{\text{max}}$  cm<sup>-1</sup>: 1682(C=O), 1618(NH).

<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O) δ:2.00 (2H, m, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-)3.03 (2H, t, J=7.4Hz, CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>)3.60 (2H, t, J=6.6Hz, -CH<sub>2</sub>-N )化合物 10 の塩酸塩

アジド体 9 (14.0g, 0.76 mmol) を EtOH (20mL) 及び濃塩酸 (0.4mL) に溶解し、10% Pd-C (3.0mL) 存在下、3.0M/cm<sup>2</sup>水素圧にて中圧接触還元を行なった。室温にて4時間後、反応を終了し、上記と同様に処理すると、1.0の HCl 塩が結晶状に得られ、MeOH-Et<sub>2</sub>O より再結晶し、純品の 10 HCl 塩 (93.0mg, 収率 63.0%) が無色針状品として得られた。

## (製造例11)



ジニトロペラトロール 1 (2.28g, 1.0mmol) を加温下 EtOH(100ml)に溶解させた。PtO<sub>2</sub>(0.23g) 存在下、記載、常圧水素気流中触媒還元を行なった。搅拌 23.5 時間後、水素の消費が完全に停止 (理論水素消費量 1.3L) したので反応を終了した。還元生成物は、すばやく窒素気流下、セライトを通し触媒を除き、沪液は、ジエチルケトマロンエート (1.74g, 1.0mmol) をあらかじめ入れておいた反応容器内へ直接導入した。反応混合溶液は、直ちに加熱還流 1 時間行なった後、室温にて一晩放置した。析出した結晶を吸引採取し、粗結晶生成物 12 (2.11g, 収率 75.8%)を得。EtOH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> より再結晶を行ない、黄緑色針状品 (1.98g)を得た。一方、結晶沪液 (0.80g) は、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (4.5L) にて精製し、1% MeOH 含有 CHCl<sub>3</sub> 滤出部より、さらに 12 (0.33g)を得。合計収率は、83.0%であった。

## 化合物 12

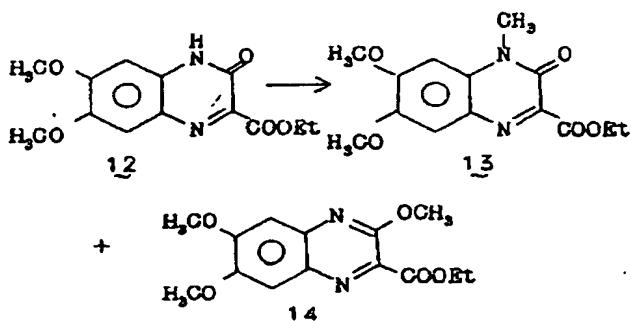
mp 250~251°C (Lit. 255°C)

NaH (0.26g, 1.097mmol) を無水 DMF (5ml) に懸滴し、本冷却 (0°C)、搅拌 塵濁液に、12 (2.03g, 7.31mmol) の無水 DMF (6.0ml) 混液を約 20 分間かけて滴加した。水素ガスの発生が終わり、溶液の色が黄色から黄褐色に変化したのを確認後 (約 20~30 分)、ヨウ化メチル (0.68ml, 1.097mmol) を約 5 分間かけて滴加した。反応混合溶液は、更に氷冷下 1.5 時間搅拌後、冰冷水 (150ml) 中に注ぎ、CHCl<sub>3</sub> (3×150ml) にて抽出した。CHCl<sub>3</sub> 抽出層は、飽和食塩にて洗浄、芒硝乾燥、溶媒留去して、黄色残渣 (2.74g)を得た。本生成物は、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (1.30g) により精製し、CHCl<sub>3</sub> : Benzene (1:1; v/v) 滤出部より、O-メチル体 14 (0.10g, 収率 4.7%) を淡黄色結晶として、また CHCl<sub>3</sub> 滤出部から N-メチル体 13 (1.72g, 収率 80.4%) を黄色結晶として得た。N-メチル体 13 は、EtOH-Et<sub>2</sub>O より再結晶し、黄色針状品を得、14 は、Et<sub>2</sub>O-n-Hexane より

(11) MS m/z(%): 278 (M<sup>+</sup>, 100), 233 (7), 204 (83), 189 (31)  
KBr  
IR ν<sub>max</sub> cm<sup>-1</sup>: 1730 及び 1650 (C=O)  
<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>+CD<sub>3</sub>OD) δ:  
1.48 (3H, t, J=7.0Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)  
3.99 及び 4.06 (each 3H, s, 2×OCH<sub>3</sub>)  
4.56 (2H, q, J=7.0Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)  
6.94 及び 7.38 (各々 1H, s, arom H)

(文献) Z.Buděšinský and A.Valenta.  
Collection Czechoslov.Chem.Commun.,  
36, 2527 (1971)

## (製造例 12)



再結晶し、淡黄色針状品を得た。

## 化合物 13

mp 166~167°C  
MS m/z(%): 292 (M<sup>+</sup>, 100), 278 (11), 277 (12), 247 (16), 220 (45), 205 (6), 192 (22), 177 (15), 147 (12)  
KBr  
IR ν<sub>max</sub> cm<sup>-1</sup>: 1730 及び 1640 (C=O)  
<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ:  
1.44 (3H, t, J=7.0Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)  
3.73 (3H, s, N-CH<sub>3</sub>)  
3.94 及び 4.05 (each 3H, s, 2×OCH<sub>3</sub>)  
4.51 (2H, q, J=7.0Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)  
6.71 及び 7.36 (each 1H, s, arom H)

## 化合物 14

mp 123~125°C

MS m/z(%): 292(M<sup>+</sup>, 100), 247(16), 220(45), 205(18), 190  
(69), 177(15), 161(12), KBr

IR ν<sub>max</sub> cm<sup>-1</sup>: 1720(C=O)

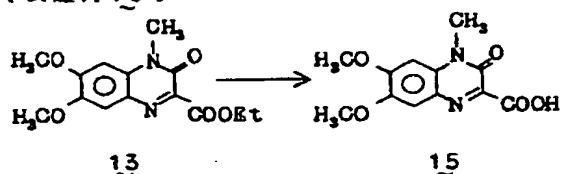
<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ:

14.6 (3H, t, J=8.0Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)  
4.00, 4.06及び4.16 (each 3H,  
S, 3×OCH<sub>3</sub>)  
4.52 (2H, q, J=8.0Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)  
7.10及び7.41 (each 1H, S, arom H)

元素分析: 計算値

測定値:

(製造例 1.3)



N-メチル体 13 (0.48g, 1.63mmol) の  
1,4-ジオキサン (5mL) 溶液に 1N NaOH 水溶液

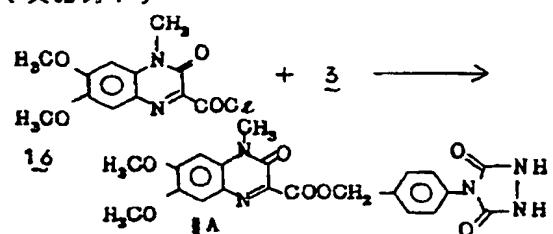
カルボン酸 15 (470mg, 1.78mmol) 及び  
SOCl<sub>2</sub> (1.0mL) の混合溶液を 1 時間加熱還流し  
た。減圧下、過剰の SOCl<sub>2</sub> を留去し、得られた  
赤褐色結晶を無水ベンゼン-カーヘキサンより再  
結晶し、黄赤色針状品の酸クロリド 16 (435mg、  
収率 86.3%)を得た。

化合物 16

mp 272-273°C (分解) [Lit.mp 261°C]  
MS m/z(%): 284(M<sup>+</sup>+2, 21), 282(M<sup>+</sup>, 62),  
247(100), 219(51), 191(42)  
KBr  
IR ν<sub>max</sub> cm<sup>-1</sup>: 1754 及び 1649(C=O)

(文献) T.Iwata, M.Yamaguchi, S.Hara and  
M.Nakamura, J.Chromatogr., 362,  
209 (1986)

(実験例 1)



(12) 液 (5mL) を加え、室温下 10 分間攪拌した。反応液は 1N HCl<sub>2</sub> を用いて弱酸性とした後、CHCl<sub>3</sub> にて、水層の蛍光が消失するまで繰り返し抽出した。合一した CHCl<sub>3</sub> 層は、水洗、芒硝乾燥後、溶媒を留去し、黄色粗結晶カルボン酸 15 (0.39g、収率 90.7%)を得た。本品は、CHCl<sub>3</sub> より再結晶を行ない、黄色針状晶を得た。

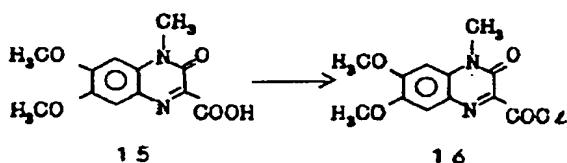
化合物 15

mp 241~243°C (Lit.mp 222°C)  
MS m/z(%): 264(M<sup>+</sup>, 27), 220(100),  
205(27), 177(16)

KBr  
IR ν<sub>max</sub> cm<sup>-1</sup>: 1742(C=O)

(文献) T.Iwata, M.Yamaguchi, S.Hara,  
M.Nakamura, and Y.Ohkura,  
J.Chromatogr., 362, 209 (1986)

(製造例 1.4)



酸クロリド 16 (113mg, 0.4mmol) を無水  
ベンゼン (8mL) に溶解し、本攪拌還流浴液に、  
ベンジルアルコール体 3 (124mg, 0.6mmol)  
の無水 DMF (0.5mL) 溶液を一気に入れ、0.5  
時間還流を継続した。3の添加と同時に黄色沈殿物  
が生成し始めた。反応液を 0°C に冷却し、析出  
結晶を吸引で取り、ベンゼンにて洗浄した。黄色  
粗結晶 (184mg) は、クロロホルムにて乾燥し  
たセファデックス LH-20 カラムクロマトグラ  
フィー (200mL) にて精製し、5% MeOH 含有  
CHCl<sub>3</sub> 滴出部より 1A (103mg, 収率 56.8%)  
を得た。本品は、MeOH - CHCl<sub>3</sub> より再結晶し、  
黄色結晶を得た。

化合物 1A

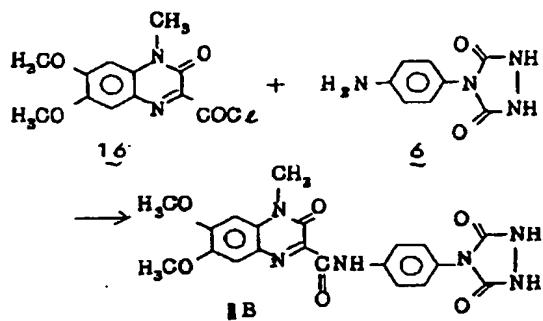
mp 279~280°C (分解)  
MS (+SIMS) m/z: 454(M<sup>+</sup>+1)  
<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>+DMSO-d<sub>6</sub>) δ:  
3.75 (3H, s, N-CH<sub>3</sub>)  
3.92 及び 4.05 (各々 3H, s, 2×OCH<sub>3</sub>)  
5.43 (2H, s, CH<sub>2</sub>ph)

6.91 及び 7.36 (各々 1H, s, arom H)  
 7.54 及び 7.58 (4H, AA' BB' ).  
 J=8.6Hz, arom H.  
 10.36 (2H, br.s, 2×NH)

元素分析：計算値

(C<sub>21</sub>H<sub>19</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>)CH<sub>3</sub>OH: C: 54.43; H: 4.78; N: 14.43  
 測定値 : C: 54.42; H: 4.35; N: 14.83

## (実験例 2)



酸クロリド 16 (2.0mg, 0.07 mmol) の無水  
 ペンゼン (2.5ml) 遷流溶液に、6 (9mg, 0.047  
 mmol) の無水 DMF (0.1ml) 溶液を一気に加  
 え、反応混合液は、1時間、加熱遷流した。反応

ジニトロベラトロール 11 (0.91g, 4 mmol)  
 を EtOH (80ml) に溶解し、PtO<sub>2</sub> (89mg)  
 存在下室温にて常圧水素気流中接触還元を行なつた。水素の消費 (理論消費量 54.0ml) が完全に停止するまで約 1.7 時間反応を継続した。生じた  
 淡黄緑色溶液は、窒素気流中セライトを通し触媒  
 を除去し、沪液は、2-ケトグルタル酸 (0.58  
 g, 4 mmol) を含む反応容器中に直膨集め、直  
 ちに加熱遷流した。1.5 時間後、反応を終了し。  
 反応液を冷却すると、粗黄色結晶が析出して來た。  
 析出結晶を吸引挿取し、キノキサリノン体 17  
 (0.80g, 収率 71.9%)を得。EtOH より再  
 結晶し黄色針状品 (0.62g) を得た。

## 化合物 17

mp 250~252°

MS m/z(%): 278 (M<sup>+</sup>, 36), 260 (100),

232 (88), 217 (32), 189

(31), 161 (21)

IR ν<sub>max</sub>cm<sup>-1</sup>: 1715 及び 1644 (C=O)<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ:

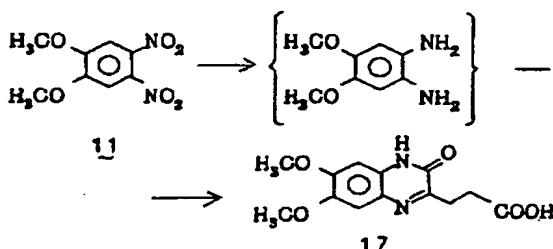
(13) 液を室温に戻してから、析出している結晶を吸引  
 捩取すると、黄色粗結晶生成物 1B (1.13g, 収  
 率 55.1%) が得られた。本品は、極めて難溶性  
 のため、以下の反応には、精製することなく使用  
 する。

## 化合物 1B

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ:

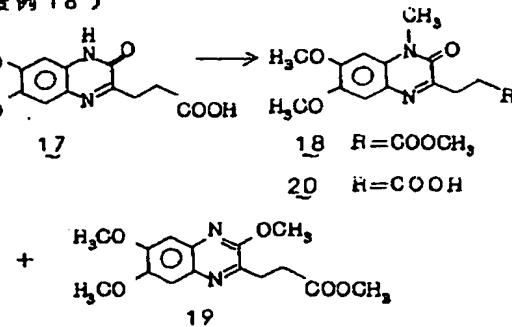
3.78 (3H, s, N-CH<sub>3</sub>)  
 3.89 及び 4.03 (各々 3H, s, 2×OCH<sub>3</sub>)  
 7.10 及び 7.47 (各々 1H, s, arom H)  
 7.45 及び 7.83 (4H, AA' BB' ),  
 J=9.0Hz, arom H)  
 10.42 (2H, s, 2×NH)

## (製造例 15)



2.80 (2H, t, J=7.3Hz, -CH<sub>2</sub>CO-)  
 3.15 (2H, t, J=7.3Hz, -CH<sub>2</sub>-)  
 3.92 及び 3.93 (各々 3H, s, 2×OCH<sub>3</sub>)  
 6.78 及び 7.18 (各々 1H, s, arom H)  
 11.92 (1H, br.sig., -COOH)

## (製造例 16)



## &lt;方法 1&gt;

冰冷した NaH (1.76g, 7.3 mmol) の無水  
 DMF (3ml) 遷流液に、攪拌下化合物 17 (606  
 mg, 2.2 mmol) の無水 DMF (2.0ml) 溶液を  
 約 2.0 分間かけて滴加し、更に 0.5 時間 0°C にて  
 攪拌を続けた。次に反応容器にヨウ化メチル

特開平4-5287 (14)

(14) カルボン酸 17 (100g, 3.60 mmol) を  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH (1:1; v/v, 1.00 L) に懸濁し、室温搅拌下ジアゾメタンのエーテル溶液を原料の 17 が消失するまで滴加した。過剰のジアゾメタンは、塗素気流にて留去した後、減圧下溶媒を留去すると、結晶性残渣 (114g) が得られた。本生成物は、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (Wacogel C-200, 50g) にて精製し、n-Hexane: AcOEt (4:1~2:1; v/v) の溶出部より N-メチル体 18 (492mg, 収率 73.8%) を得。 MeOH-CHCl<sub>3</sub> より再結晶し、淡黄色針状晶を得た。O-メチル体 19 は、極微量得られたにすぎなかつた(方法Ⅰ参照)。

一方、CHCl<sub>3</sub> 抽出後の水層は、0.5N HCl にて酸性とした後、5% MeOH 含有 CHCl<sub>3</sub> にて再抽出し、有機層は、飽和食塩水にて洗浄、芒硝乾燥、溶媒留去するとカルボン酸 20 (86mg, 13.5%) が結晶状に得られた。本品を MeOH-CHCl<sub>3</sub> より再結晶すると黄色針状晶が得られた。

<方法Ⅱ>

KBr  
IR  $\nu_{\text{max}} \text{cm}^{-1}$ : 1740 及び 1651 (C=O)

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ:

2.86 (2H, t, J=7.1Hz, -CH<sub>2</sub>CO)  
3.25 (2H, t, J=7.1Hz,  $\text{CH}_2-$ )  
3.69 及び 3.70 (各々 3H, s, N-CH<sub>3</sub>, COOCH<sub>3</sub>)  
3.96 及び 4.01 (各々 3H, s, 2×OCH<sub>3</sub>)  
6.68 及び 7.25 (各々 1H, s, arom H)

化合物 19

mp 137~139°C

MS m/z(%): 306 (M<sup>+</sup>, 51), 275 (10), 247 (100), 203 (10)

KBr  
IR  $\nu_{\text{max}} \text{cm}^{-1}$ : 1729 (C=O)

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ:

2.89 (2H, m)  
3.24 (2H, m)  
3.71 (3H, s, COOCH<sub>3</sub>)  
4.00 及び 4.02 及び 4.07 (各々 3H, s, 3×OCH<sub>3</sub>)  
7.17 及び 7.27 (each 1H, s, arom H)

化合物 20

mp 239~241°C

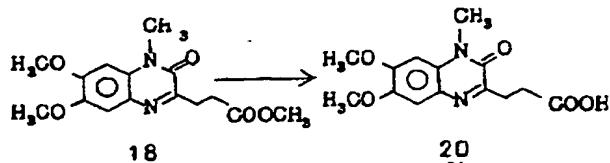
MS m/z(%): 292 (M<sup>+</sup>, 53), 274 (99), 246 (100), 231 (53), 203 (41), 175 (27)

KBr  
IR  $\nu_{\text{max}} \text{cm}^{-1}$ : 1734 及び 1628 (C=O)

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ:

2.70 (2H, t, J=6.9Hz, CH<sub>2</sub>CO)  
3.00 (2H, t, J=6.9Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO)  
3.65 (3H, s, N-CH<sub>3</sub>)  
3.84 及び 3.94 (各々 3H, s, 2×OCH<sub>3</sub>)  
6.98 及び 7.22 (各々 1H, s, arom H)

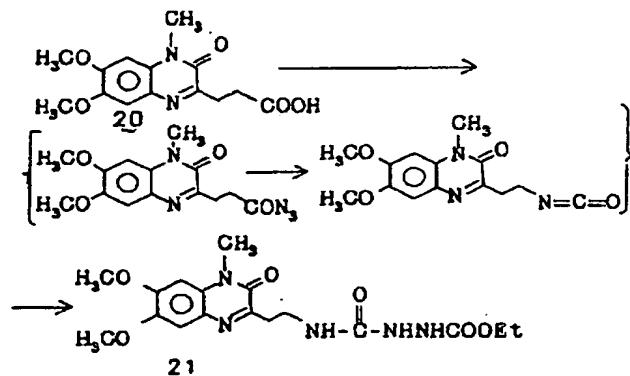
(製造例 17)



N-メチル体 18 (115g, 3.75 mmol) を 1.4-ジオキサン (18mL) 及び 1N NaOH 水溶液 (10mL) に溶解し、室温下 10 分間搅拌反応

させた。反応混合液は、希塩酸性とした後、10% MeOH含有 CHCl<sub>3</sub>にて水層の蛍光が消失するまで抽出を繰り返した。合一した有機層は、飽和食塩水にて洗浄、芒硝乾燥、溶媒留去し、粗結晶カルボン酸 20 (105g、収率 95.9%)を得た。本品は、MeOH-CHCl<sub>3</sub>より再結晶し、純品 20 (852mg)得、このものは、先に得ている化合物 20 と一致した。

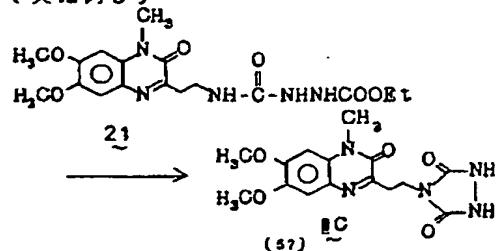
## (製造例 18)



カルボン酸 20 (500mg、1.71mmol)を無水 DMSO (12ml)に溶解し、本搅拌溶液にて

KBr  
IR  $\nu_{\text{max}}$  cm<sup>-1</sup>: 1731, 1669 及び 1649 (C=O)  
<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ:  
11.8 (3H, t, J=6.9Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)  
2.95 (2H, t, J=5.9Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH-)  
3.52 (2H, m, CH<sub>2</sub>NH)  
3.67 (3H, s, N-CH<sub>3</sub>)  
3.89 及び 3.97 (各々 3H, s, 2×OCH<sub>3</sub>)  
4.02 (2H, q, J=6.9Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)  
6.40 (1H, br, sig, NH)  
6.91 及び 7.31 (各々 1H, s, arom H)  
7.70 (1H, br, s, NH)  
8.65 (1H, br, sig, NH)

## (実施例 3)



(15) リエチルアミン (0.36ml, 2.57mmol)、ジフェニルリン酸アシド (0.55ml, 2.57mmol) を順次滴加した。反応 1 時間後にジフェニルリン酸アシド (0.34mmol) を追加し、更に 1.5 時間室温下搅拌を行ない、淡黄色溶液を得た。減圧下速やかに溶媒留去し、残渣を高真空下乾燥した。乾燥生成物に無水ベンゼン (20ml) を加え、混合溶液を 1 時間加熱還流した。一度反応液を室温に戻した後、カルバジン酸エチル (1.78ml, 1.71mmol) を加えた。反応液は、再び 0.5 時間還流後、更に室温下 0.5 時間搅拌し、溶媒を留去した。得られた淡黄色残渣 (1.976g) は、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (90g) にて精製し、4~5% MeOH 含有 CHCl<sub>3</sub> 溶出部よりセミカルバゾン 21 (230mg)を得た。未分離分画は、再シリカゲルカラムクロマトグラフィー (1.5g) に対し、更に 21 (164mg)を得、合計収率は 58.6% であった。

## 化合物 21

MS m/z(%): 393 (M<sup>+</sup>, 5), 347 (0.8).

セミカルバゾン 21 (272mg, 0.69mmol)、粉碎した無水炭酸カリウム (191mg, 1.38mmol) 及び abs EtOH (20ml) の懸濁液を 6 時間、加熱還流した。減圧下溶媒留去し、残渣に水 (30ml) を加え、2N HCl にて酸性とした。水層は、10% MeOH 含有 CHCl<sub>3</sub> (3×50ml) にて抽出し、有機層は、飽和食塩水にて洗浄、芒硝乾燥、溶媒留去すると、淡黄色結晶 (222mg) が得られ、MeOH-CHCl<sub>3</sub> より再結晶し、黄色ブリズム晶として、IC (130mg) を得た。結晶母液 (70ml) は、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (10g) にて精製し、5% MeOH 含有 CHCl<sub>3</sub> 溶出部より更に IC (64mg) を得、合計収率は 80.8% であった。

## 化合物 IC

mp 250~253°C

MS m/z(%): 347 (M<sup>+</sup>, 5), 289 (2).

246 (100), 231 (35), 203

(20), 175 (20), 101 (12)

KBr IR  $\nu_{\text{max}}$  cm<sup>-1</sup>: 1694 及び 1640 (C=O)

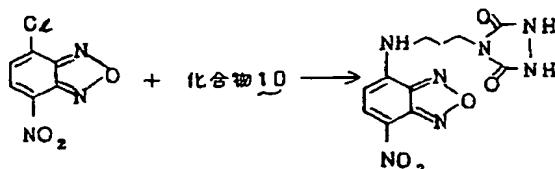
<sup>1</sup>H-NMR(DMSO-d<sub>6</sub>) δ:

3.02 (2H, t, J=6.9Hz,  
3.65 (3H, s, N-CH<sub>3</sub>)  
3.80 (2H, t, J=6.9Hz,  
3.84 及び 3.95 (各々 3H, s, 2×OCH<sub>3</sub>)  
6.96 及び 7.26 (各々 1H, s, arom H)  
9.95 (2H, s, 2×NH)

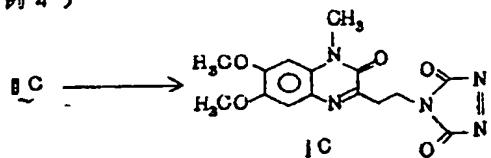
(16)る。

化合物 ICIR ν<sub>max</sub> cm<sup>-1</sup>: 1785, 1770 及び 1640 (C=O)

(実施例 5)



(実施例 4)



トリアゾリジン ID (10.0 mg, 0.029 mmol) の無水 DMF (1 mL) 溶液に PhI(OAc)<sub>2</sub> (112 mg, 0.35 mmol) を加え、室温にて1時間搅拌した。減圧下 DMF を留去すると赤色固体状残渣が得られた。本品を CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-benzene より結晶化すると、極微量であるが、目的の ID の赤色プリズム晶が得られて來た。現在、大量に純品の ID を得るための方法(昇華法等)を検討中である。

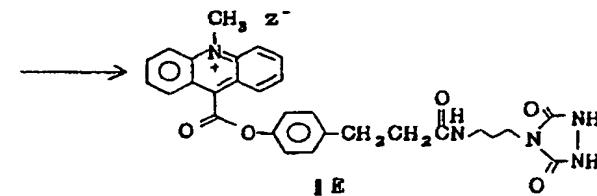
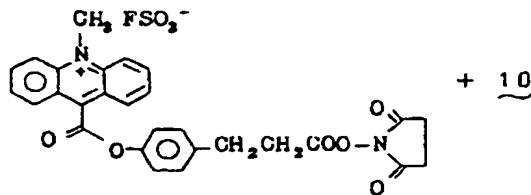
アミノ体 ID (9.8 mg, 0.05 mmol) 及び炭酸カリウム (15.2 mg, 0.11 mmol) の水溶液 (0.25 mL) K7-クロロ-4-ニトロベンソフラザン (8.3 mg, 0.041 mmol) の EtOH (1 mL) 溶液を約5分間かけて滴加した。生じた暗紫色溶液は、室温で10分搅拌した後、60-70℃にて5分間加熱搅拌した。暗紫色反応懸濁液は、2N HClにて酸性にすると暗赤色溶液となつた。減圧下懸濁液を留去し、得られた残渣 (4.45 mg) は、ODSカラムクロマトグラフィー (Waters社、分取用ODS充填剤5 g) にて精製した。カラム

は、20% MeOH 含有水にて溶出し、トライアゾリジン ID (9.5 mg, 収率 70.9%) を黄赤色粘着性物質として得た。

化合物 IDIR ν<sub>max</sub> cm<sup>-1</sup>: 1688 (C=O)1586 及び 1301 (NO<sub>2</sub>)MS m/z(%): no M<sup>+</sup><sup>1</sup>H-NMR(DMSO-d<sub>6</sub>) δ:

1.99 (2H, m)  
3.4-3.5 (4H, m)  
6.42 (1H, d, J=9.2Hz, arom H)  
8.51 (1H, d, J=9.2Hz, arom H)  
9.42 (1H, m, NH)  
10.10 (2H, s, 2×NH)

(実施例 6)



N-メチルアクリリジニウム

4-(2-サクシニミジルオキシカルボニルエチル)

フェニル-10-メチルアクリリジニウム-9-カルボキ

シレート フルオロスルホネート

N-メチルアクリリジニウム (2.2 mg, 0.038 mmol) の無水 DMF (0.5 mL) 溶液にアミノ体 ID (7.6 mg, 0.048 mmol) を加え、生じた反応懸濁液を外浴 50-60℃にて6時間加熱搅拌した。減圧下 DMF を留去し、暗黄色残渣 (4.35 mg) K塩酸水溶液 (0.057 mmol) の塩化水素に相当する量) 及び MeOH を加え残渣を溶解した。再び懸濁液を留去し、残渣をセファデックス LH-20 カラムクロマトグラフィー (5.5 mL) にて精製した。EtOH にてカラムを充填し、EtOH にて溶出せしめた。溶出容量 3.7-4.6

此の黄色分画を集め化合物 E (2.2.4-メチル-取率 94.8%)を得た。

化合物 I E

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ:

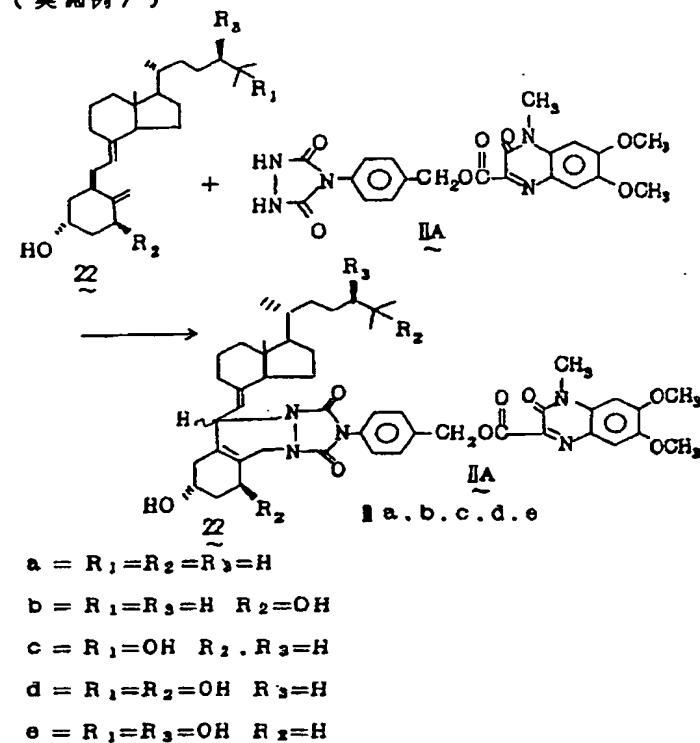
167 (2H, m, -HNCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-)  
 2.46 (2H, t, J=7.3Hz, -CH<sub>2</sub>C(=O)-)  
 2.94 (2H, t, J=7.6Hz, PhCH<sub>2</sub>-)  
 3.06 (2H, m, -HNCH<sub>2</sub>-)  
 3.36 (2H, t, J=6.6Hz, -CH<sub>2</sub>N-)  
 4.97 (3H, s, +N-CH<sub>3</sub>,)  
 7.46 & 7.65 (4H, AA'BB' .  
                   J=8.6Hz, arom H)  
 7.92 (1H, m, NH)  
 8.19 (2H, m, arom H)  
 8.57 (2H, m, arom H)  
 8.62 (2H, d, J=8.6Hz, arom H)  
 8.96 (2H, d, J=9.2Hz, arom H)  
 9.10 (2H, br s, 2xNH)

#### 以下に不透明化合物とビタミンD類との反応例

## Diels-Alder Adducts (ディールスーアルダーアダクツ)

＜方法1＞  $Pb(OAc)_4$  による I-A の酸化・引き続く D.A. 反応

Vitamin D<sub>3</sub> 22a (9.1 mg, 0.024 mmol), Ia (12.9 mg, 0.028 mmol), 無水DMF (0.2 mL), 無水THF (0.3 mL) 及び gl. AcOH (5 μL) の懸濁液を-75°Cに冷却し、本現拌液に Pb(OAc)<sub>4</sub> (18.9 mg, 0.043 mmol) を加えた。反応懸濁液は、Pb(OAc)<sub>4</sub> 添加5分後より赤色を帯びて来た。反応液は1時間-75°Cにて搅拌した後、室温に戻し更に1時間反応を行なった。反応混合物を氷冷水に注ぎ、CHCl<sub>3</sub> (3 × 1.5 mL) にて抽出した。CHCl<sub>3</sub> 層は、飽和食塩水にて洗浄、芒硝乾燥、溶媒留去した。得られた黄色粘着性物質 (22.0 mg) は、Preparative TLC (Merck社製、silica gel 60 F<sub>254</sub> · 20 cm (W) × 10 cm (H) × 0.5 cm (T) × 4枚、展開溶媒 2% MeOH 含有 CHCl<sub>3</sub>) にて精製し、主成積体 Ia (C<sub>6</sub>-αH: 9.0 mg) 及びその異性体



■ a' (C<sub>6</sub>- $\beta$ H: 1.6 mg)を得た。合計収率は、53.5%であった。■ a (C<sub>6</sub>- $\alpha$ H)は、黄色結晶として得られ、MeOH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>より再結晶し、黄色針状晶を得た。

### 化合物 II a (C<sub>6</sub>-aH)

mp 143~145°C

UV  $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$  nm(log ε): 217(4.72).

24 (Shoulder) .322 (3.80).

401(4.07).

#### 元素分析：计算值

(C<sub>18</sub>H<sub>61</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>.H<sub>2</sub>O): C. 67.50; H. 7.43; N. 8.20.

測定值 : C.67.08; H.7.18; N.8.12.

＜方法2＞  $\text{PhI(OAc)}_3$ による IAの酸化・引き続きビタミンDとの反応

1 A (1.00 mM, 0.022 mmol) の無水 DMSO (1 ml) 溶液に、 $\text{PhI(OAc)}_2$  (7.5 mM, 0.023 mmol) を加え、室温搅拌下、反応液が十分な赤色を呈するまで約 0.5~1 時間搅拌を継続した。本赤色溶液に、 $24.25(\text{OH})_3\text{D}_3\text{22e}$  (5.0 mM, 0.012 mmol) を加え、溶液の赤色が消失する

(18)  
まで更に15時間攪拌した。減圧下溶媒を留去し。

黄褐色粘着性物質(24.1mg)を得、preparative

TLC (Merck社製 Silica gel 60 F<sub>254</sub>・

20cm(W)×10cm(H)×0.5cm(T)×4枚・展

開溶媒5% MeOH含有CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)にて精製し、

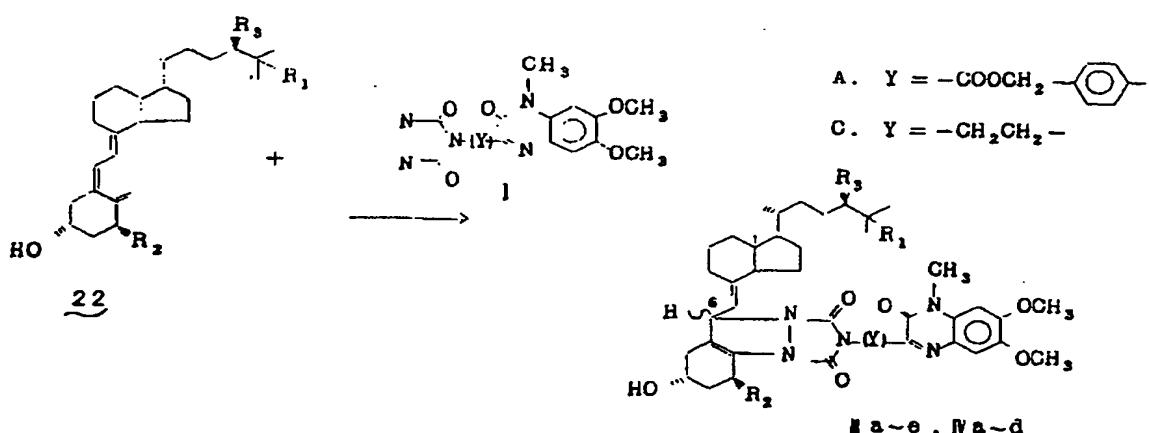
付加体 $\text{Ie}$ (C<sub>6</sub>- $\alpha$ H &  $\beta$ Hの混合物、10.4mg、

収率定量的)を非結晶性黄色粘着性物質として得た。

このようにして得たビタミンD類と本発明試薬

との付加体の異性体生成比及び収率を第1表に示す。

第1表



Entry	ジエン類 (ビタミンD <sub>3</sub> 類)	ジエノフィル a)	付加体 (異性体生成比)	b)	吸率c) (%)
1	ビタミンD <sub>3</sub> (R <sub>1</sub> =R <sub>2</sub> =R <sub>3</sub> =H)	I A	IIa (R <sub>1</sub> =R <sub>2</sub> =R <sub>3</sub> =H) (6:1)	54	
2	1 $\alpha$ (OH)D <sub>3</sub> (R <sub>1</sub> =R <sub>3</sub> =H, R <sub>2</sub> =OH)	I A	IIb (R <sub>1</sub> =R <sub>3</sub> =H, R <sub>2</sub> =OH) (1:1)	77	
3	25(OH)D <sub>3</sub> (R <sub>1</sub> =OH, R <sub>2</sub> =R <sub>3</sub> =H)	I A	IIIc (R <sub>1</sub> =OH, R <sub>2</sub> =R <sub>3</sub> =H) (4.4:1)	86	

(19)

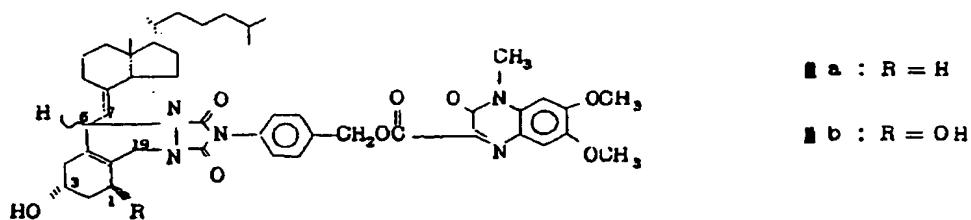
4.	$1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ( $\text{R}_1=\text{R}_2=\text{OH}, \text{R}_3=\text{H}$ )	I A	<u>II d</u> ( $\text{R}_1=\text{R}_2=\text{OH}, \text{R}_3=\text{H}$ ) (1 : 1)	63
5.	$24\text{R}, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ( $\text{R}_1=\text{R}_3=\text{OH}, \text{R}_2=\text{H}$ )	I A	<u>II e</u> ( $\text{R}_1=\text{R}_3=\text{OH}, \text{R}_2=\text{H}$ ) (5 : 1)	100
6.	ビタミン D <sub>3</sub>	I C	<u>IV a</u> ( $\text{R}_1=\text{R}_2=\text{R}_3=\text{H}$ ) (28 : 1)	78
7.	$25(\text{OH})\text{D}_3$	I C	<u>IV b</u> ( $\text{R}_1=\text{OH}, \text{R}_2=\text{R}_3=\text{H}$ ) (2.8 : 1)	67
8.	$1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$	I C	<u>IV c</u> ( $\text{R}_1=\text{R}_2=\text{OH}, \text{R}_3=\text{H}$ ) (24 : 1)	86
9.	$24\text{R}, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$	I C	<u>IV d</u> ( $\text{R}_1=\text{R}_3=\text{OH}, \text{R}_2=\text{H}$ ) (3.7 : 1)	47

注 a) I A 及び C の酸化型トリアゾリン I A 及び C は、  $\text{PhI}(\text{OAc})_2$  を用いて反応系内にて合成した。(ただし、Entry 1 は、  $\text{Pb}(\text{OAc})_4$  を用いた時の結果を示してある)b) C-6 位における  $\alpha$  及び  $\beta$ -H 型の異性体の生成比は、 HPLC を用い、各ピークの面積比より求めた結果を示してある。

c) 収率は二つの異性体の合計収率を示してある。また単離収率を示した。

■ a 及び ■ b の化合物については、  $\text{C}_6-\alpha\text{H}$  及び  $\beta\text{H}$  体をそれぞれ分離し、  $^1\text{H-NMR}$  を測定した。結果を第 2 表に示す。

第 2 表



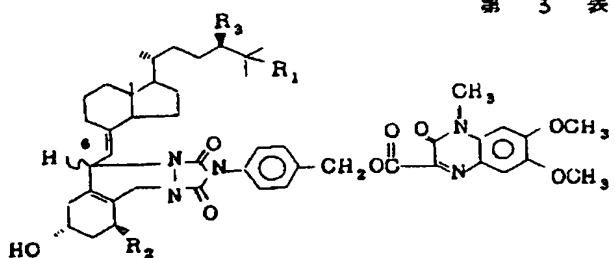
	■ a (R=H)		■ b (R=OH)	
	主生成物	極性小	副生物	極性大
18-CH <sub>3</sub>	0.50 (s)	0.54 (s)	0.53 (s)	0.50 (s)
26-CH <sub>3</sub>	0.85 (d, J=6.6)	0.86 (d, J=6.6)	0.86 (d, J=6.6)	0.85 (d, J=6.6)
27-CH <sub>3</sub>	0.86 (d, J=6.6)	0.87 (d, J=6.6)	0.87 (d, J=6.6)	0.86 (d, J=6.6)
21-CH <sub>3</sub>	0.89 (d, J=5.9)	0.91 (d, J=6.3)	0.91 (d, J=5.9)	0.89 (d, J=5.9)
4-H	-	-	2.51 (m)	2.26 (m)
19-H	3.88 (AB, J=17.0)	3.85 (AB, J=15.5)	3.86 (AB, J=16.1)	0

(20)

19-H	4.17 (AB, J=17.0)	4.16 (AB, J=15.5)	4.69 (AB, J=16.1)	○ } 4.26 (m)
3-H	4.12 (m)	4.10 (m)	4.20 (m)	○ }
1-H	-	-	4.36 (m)	4.43 (m)
6-H	4.77 (AB, J=9.9)	4.76 (AB, J=9.9)	4.80 (AB, J=9.9)	4.75 (AB, J=9.9)
7-H	4.96 (AB, J=9.9)	5.00 (AB, J=9.9)	5.05 (AB, J=9.9)	5.01 (AB, J=9.9)
N-CH <sub>3</sub>	3.74 (s)	3.74 (s)	3.74 (s)	3.74 (s)
2×OCH <sub>3</sub>	3.95(s) 4.05(s)	3.94(s) 4.05(s)	3.95(s) 4.05(s)	3.95(s) 4.05(s)
CH <sub>3</sub> , ph	5.47 (s)	5.45 (s)	5.47 (s)	5.48 (s)
Arom-H	6.68(s) 7.38(s)	6.68(s) 7.34(s)	6.68(s) 7.38(s)	6.68(s) 7.39(s)
Arom-H	7.59 & 7.50 (AA' BB', J=8.6)	7.58 & 7.54 (AA' BB', J=8.6)	7.54 & 7.59 (AA' BB', J=8.6)	7.50 & 7.59 (AA' BB', J=8.6)

■c, ■d及び■eの化合物については立体異性体を分離することなく<sup>1</sup>H-NMRを測定した。結果を第3表に示す。

第3表

■c : R<sub>1</sub>=OH, R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=H■d : R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=OH, R<sub>3</sub>=H■e : R<sub>1</sub>=R<sub>3</sub>=OH, R<sub>2</sub>=H

	■c (R <sub>1</sub> =OH, R <sub>2</sub> =R <sub>3</sub> =H) 主生成物	■d (R <sub>1</sub> =R <sub>2</sub> =OH, R <sub>3</sub> =H) C <sub>6</sub> -αH <sub>2</sub> /βH 1:1 混合物	■e (R <sub>1</sub> =R <sub>3</sub> =OH, R <sub>2</sub> =H) 主生成物	副生物
18-CH <sub>3</sub>	0.50 (s)	0.54 (s)	0.51 (s)	0.51 (s)
26&#26;27-CH <sub>3</sub>	1.20 (s)	1.20 (s)	1.21 (s)	1.15(s) 1.20(s)
21-CH <sub>3</sub>	0.91 (d, J=5.9)	0.91 (d, J=5.9)	0.92 (d, J=6.3)	0.91 (d, J=5.9)
4-H	-	2.26 (m)	2.50 (m)	-
19-H	3.88 (AB, J=15.5)	3.86 (AB, J=17.8)	○ }	3.88 (AB, J=15.8)

(21)

19-H	4.17 (AB, J=15.5)	-	4.70 (AB, J=17.8)	o } 4.26 o } (m)	4.17 (AB, J=15.8)	-
3-H	4.12 (m)	-	4.20 (m)		4.12 (m)	-
1-H	-		4.34 (m)	4.43 (m)	-	
6-H	4.77 (AB, J=9.9)	-	4.80 (AB, J=9.6)	4.75 (AB, J=9.9)	4.77 (AB, J=9.8)	-
7-H	4.97 (AB, J=9.9)	-	5.04 (AB, J=9.6)	5.00 (AB, J=9.9)	4.96 (AB, J=9.8)	-
24-H	-		-	-	3.32 (m)	-
N-CH <sub>3</sub>	3.74 (s)	-	3.740 (s)	3.742 (s)	3.74 (s)	-
2xOCH <sub>3</sub>	3.95(s)	-	3.95(s)	-	3.95(s)	-
	4.05(s)	-	4.05(s)	-	4.05(s)	-
CH <sub>2</sub> ph	5.48 (s)	5.47 (s)	5.47 (s)	5.48 (s)	5.47 (s)	-
Arom-H	6.68(s)	-	6.69(s)	-	6.68(s)	-
	7.383(s)	7.376(s)	7.384(s)	7.378(s)	7.38(s)	7.37 (s)
Arom-H	7.50及び7.58 (AA' BB', J=8.9)	-	7.50及び7.54 (AA' BB', J=8.9)	7.56及び7.59 (AA' BB', J=8.9)	7.50及び7.58 (AA' BB', J=8.6)	-

ビタミンD<sub>3</sub>誘導体と本発明医薬(化合物)Aとの付加物である化合物c、d及びeの混合液について、HPLC(高速液体クロマトグラフイー)による分離を次の条件により行なった。

#### HPLC 分離条件

カラム: Li Chrospher 100 R P-18 (e) (5μm)

4 mm × 250 mm

溶離剤: 水:メタノール=27:73(v/v)

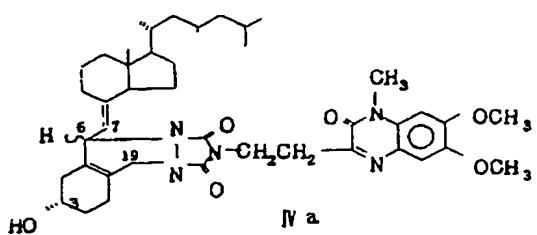
流速: 1 ml/分

検出: Ex 395 nm, Em 500 nm

サンプルサイズ: [c(~6ng)+d(~6ng)+e(~6ng)]/10μLエタノール

結果を第1図に示す。図中、c、d、eは主生成物を、c'、d'、e'は副生物をそれぞれ表わす。

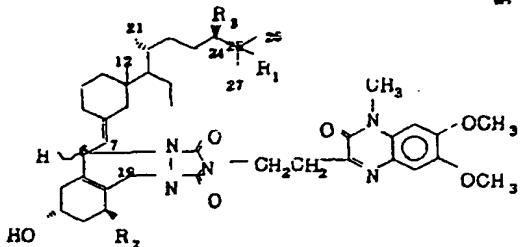
化合物aの2つ異性体(C<sub>6</sub>-αH及びβH)は preparative TLCによりそれぞれ分離してから、<sup>1</sup>H-NMRを測定した。結果を第4表に示す。

(22)  
第 4 表

	IV a	IV a
	主生成物 ( 極性小 )	副生物 ( 極性大 )
18-CH <sub>3</sub>	0.52 ( 3H . s )	0.51 ( 3H . s )
26及27-CH <sub>3</sub>	0.85 ( 3H . d , J = 6.6 ) 0.86 ( 3H . d , J = 6.6 )	0.86 ( 3H . d , J = 6.6 ) 0.87 ( 3H . d , J = 6.6 )
21-CH <sub>3</sub>	0.90 ( 3H . d , J = 5.9 )	0.91 ( 3H . d , J = 5.9 )
	3.20 ( 2H . m )	3.23 ( 2H . t , J = 6.7 )
N-CH <sub>3</sub>	3.70 ( 3H . s )	3.69 ( 3H . s )
2×OCH <sub>3</sub>	3.94 ( 3H . s ) 4.01 ( 3H . s )	3.94 ( 3H . s ) 4.01 ( 3H . s )
3-H		
19-H <sub>2</sub>	N-CH <sub>3</sub> 及び 2 × OCH <sub>3</sub> とオーバーラップ	
6-H	4.69 ( 1H . AB , J = 10.1 )	4.66 ( 1H . AB , J = 10.1 )
7-H	4.87 ( 1H . AB , J = 10.1 )	4.88 ( 1H . AB , J = 10.1 )
AROM-H	6.68 ( 1H . s ) 7.23 ( 1H . s )	6.67 ( 1H . s ) 7.22 ( 1H . s )

IV b, IV c 及び IV d の化合物について、異性体を分離することなく  $^1\text{H-NMR}$  を測定した。結果を第 5 表に示す。

表 5



IV b :  $R_1=OH, R_2=R_3=H$

IV c :  $R_1=R_2=OH, R_3=H$

IV d :  $R_1=R_3=OH, R_2=H$

	IV b ( $R_1=OH, R_2=R_3=H$ ) 主生成物	副生物	IV c ( $R_1=R_2=OH, R_3=H$ ) 主生成物	副生物	IV d ( $R_1=R_3=OH, R_2=H$ ) 主生成物	副生物
18-CH <sub>3</sub>	0.52 (s)	0.51 (s)	0.50 (s)	0.51 (s)	0.54 (s)	0.52 (s)
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \diagdown \\ \text{CH}_2\text{CH}_2 \end{array}$	120 (s)	121 (s)	121 (s)	120 (s)	116(s) 121(s)	- -
21-CH <sub>3</sub>	0.91 (d, J=6.3)	- -	0.92 (d, J=5.9)	- -	0.92 (d, J=5.9)	- -
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \diagdown \\ \text{CH}_2\text{CH}_2 \end{array}$	3.21 (m)	- -	3.22 (t, J=6.6)	- -	3.1~3.3 (m)	- -

N-CH <sub>3</sub>	3.69 (s)	-	3.69 (s)	-	3.70 (s)	-
2×OCH <sub>3</sub>	3.94(s) 4.01(s)	-	3.94(s) 4.01(s)	-	3.94(s) 4.01(s)	-
1-H			4.30 (m)	4.35 (m)		
19-H	o		4.51 (AB, J=15.8)	-	o	
19-H	o	N-CH <sub>3</sub> 及び 2×OCH <sub>3</sub> と			o	N-CH <sub>3</sub> 及び 2×OCH <sub>3</sub> と
3-H	o	オーバーラップ	N-CH <sub>3</sub> 及び 2×OCH <sub>3</sub> と オーバーラップ		o	オーバーラップ
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \diagdown \\ \text{CH}_2\text{CH}_2 \end{array}$	o				o	
6-H	4.69 (AB, J=9.6)	-	4.70 (AB, J=9.9)	-	4.69 (AB, J=9.6)	-
7-H	4.88 (AB, J=9.6)	-	4.93 (AB, J=9.9)	-	4.88 (AB, J=9.6)	-
Arom-H	6.68(s) 7.23(s)	-	6.68(s) 7.23(s)	-	6.68(s) 7.23(s)	-

ビタミンD<sub>3</sub>誘導体と本発明試薬(化合物I-C)との付加物である化合物IVb・IVc及びIVdの混合液について、HPLCによる分離を次の条件で行なった。

## HPLC 分離条件

カラム：Li Chrospher 1.00RP-18 (5 μm)

4 mm × 250 mm

溶離剤：(直線的勾配溶離による)

0分 水：メタノール = 40 : 60

30分後 水：メタノール = 20 : 80

40分後 水：メタノール = 20 : 80

流速：1 mL/分

検出：Ex. 370 nm, Em. 440 nm.

サンプルサイズ：[IVb(~15 ng) + IVc(~12 ng) + IVd(~15 ng)] / 10 μL エタノール

結果を第2図に示す。図中、IVb・IVc・IVdは主生成物を、IVb'・IVc'・IVd'は副生成物をそれぞれ表わす。

以下に本発明化合物とビタミンA類との反応例について説明する。

TLCで10% MeOH/CHCl<sub>3</sub>を用いて精製する。Vaの収量1.1 mg (44%)。

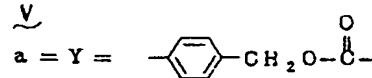
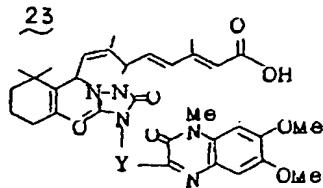
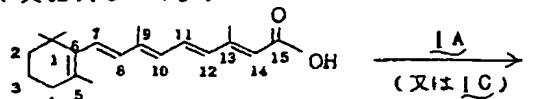
Va：UV (95% EtOH) 400, 307, 247, 218 nm, IR(KBr) 1770, 1719, 1655 cm<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>H NMR(CDCl<sub>3</sub>) δ 1.05 及び 1.14 (各々 3H, s, Me-1), 1.75 (3H, s, Me-5), 1.81 (3H, s, Me-9), 2.21 (3H, s, Me-13), 3.73 (3H, s, NMe), 3.94 及び 4.04 (各々 3H, s, OMe), 4.83 (1H, s, H-7), 4.85 (1H, d, J = 8.6, H-10), 5.47 (1H, s, H-8), 5.83 (1H, s, H-14), 5.45 (2H, s, O-CH<sub>2</sub>), 6.02 (1H, dd, J = 15 及び 8.6, H-11), 6.47 (1H, d, J = 15, H-12), 6.67 及び 7.37 (each 1H, s, キノキサリン), 7.55 及び 7.58 (each 2H, AA' BB', J = 9, Ar)

## (実施例9) ビタミンA酸(Retinoic acid)

## (24) 光活性求ジエン試薬とビタミンA誘導体との反応

## (実施例8～10)



## (実施例8) ビタミンA酸(Retinoic acid)

## (23) と発光試薬 I-Aとの反応

I-A (2.2 mg, 5.0 μmol) の DMF 溶液 (2 mL) に PhI(OAc)<sub>2</sub> (1.6 mg, 5.0 μmol) を加え室温で30分攪拌し、I-Aを調製する。この溶液を retinoic acid (1.0 mg, 3.3 μmol) の CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2.0 mL) 溶液に0℃でAr気流下滴下する。0℃30分後溶液を留去し、シリカゲルの

I-C (7 mg, 20 μmol) の DMF (500 μL) の溶液に PhI(OAc)<sub>2</sub> (7.8 mg, 24 μmol) を加え室温で30分攪拌し、I-Cの淡赤色溶液を調製する。Retinoic acid (3.5 mg, 1.2 μmol) の CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1.0 mL) 溶液に上記I-Cの溶液を0℃にて加えAr気流下30分間攪拌する。粗末を留去し残渣をシリカゲルの TLC で10% MeOH / CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>にて精製し、付加体Vb (5 mg, 66%)を得る。

Vb UV(95% EtOH) 368, 244, 213 nmIR(KBr) 1771, 1715, 1649 cm<sup>-1</sup>MS m/e 646(M<sup>+</sup>-1), 601, 399, 355

<sup>1</sup>H NMR(CDCl<sub>3</sub>) δ 0.88 及び 0.95 (各々 3H, s, Me-1), 1.59 (3H, s, Me-5), 1.77 (3H, s, Me-9), 2.19 (3H, s, Me-13), 3.67 (3H, s, NMe), 3.93 及び 4.01 (各々 3H, s, OMe), 4.61 (1H, s, H-7), 4.74 (1H, d, J = 8.6, H-10), 5.37 (1H, s, H-8), 5.86 (1H, s, H-14), 5.96 (1H,

(23) と I-Cとの反応

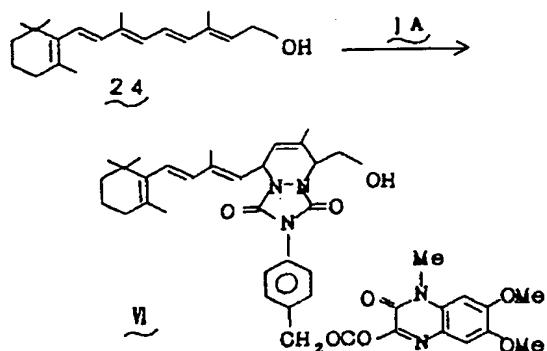
dd,  $J = 1.5$  及  $8.6$ , H-11), 6.35(1H,  
d,  $J = 1.5$ , H-12), 3.2 及 4.0(各  
2H, m,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ )

(25) 50:1を基盤に用いて構成し、付加体 $\eta$  (14%、55%)を得る。

### 化合物物：

IR(KBr) 3440, 1771, 1711, 1655  
cm<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) 0.992 及び 0.987 (各々  
 3H, s, Me-1), 1.66 (3H, s, Me-5),  
 1.99 (3H, s, Me-9), 1.91 (3H, s,  
 Me-13), 3.74 (3H, s, NMe), 3.95 及び  
 4.05 (各々 3H, s, OMe), 3.56 (1H, dd,  
 J = 8 及び 4, OH, D<sub>2</sub>O 添加消失), 4.24 及  
 び 3.87 (各々 1H, m, H-15), 4.44 (1H,  
 d, J = 6, H-14), 5.22 (1H, d, J = 9,  
 H-10), 5.31 (1H, m, H-11), 5.70  
 (1H, m, H-12), 5.99 (1H, d, J =  
 16.5, H-8), 6.17 (1H, d, J = 16.5,  
 H-7)  
 MS      m/e 491 (M<sup>+</sup>-CO)



(実施例 10) ビタミン A (Retinol) (24) と  
IA の反応

IA (15 mg, 35  $\mu$ mol) より調製した IA の DMF 溶液を retinol (24) (10 mg, 35  $\mu$  mol) の  $\text{CH}_3\text{Cl}_2$  (20 mL) 溶液に -78°C で加え、30 分攪拌する。蒸発留去後残渣をシリカゲルのカラムで AcOEt /  $\text{CHCl}_3$  / EtOH 50 :

発明の効果

以上説明したように本発明により合成した蛍光もしくは化学発光試薬は cis-ジエンを持つ化合物と速く特異的かつ定量的に反応する。従ってこれらの試薬は cis-ジエンを持つ化合物、特にビタミンD<sub>3</sub>、Aおよびそれらの代謝物の検出・定量分析に適している優れた試薬であるということができる。

#### 4. [ 図面の簡単な説明 ]

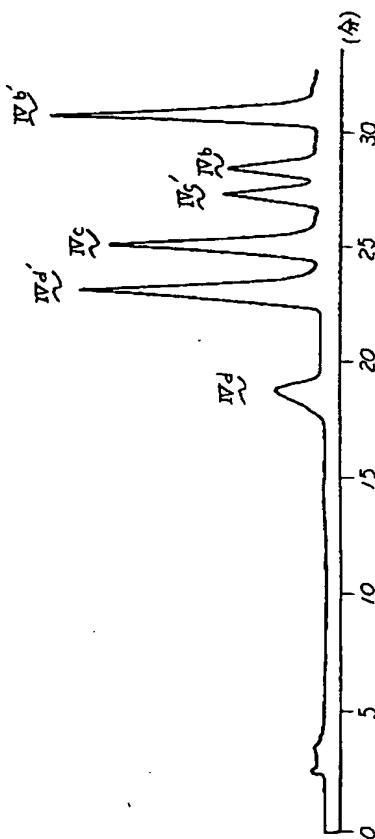
第1図は、ビタミンD<sub>3</sub>各誘導体と本発明試葉IAとの付加体をHPLCによって分離した後に検出した各々の付加体のピークを表わすクロマトグラムである。

第2図は、ビタミンD<sub>3</sub>、各誘導体と本発明試験ICとの付加体をHPLCによって分離した後に検出した各々の付加体のピークを表わすクロマトグラムである。

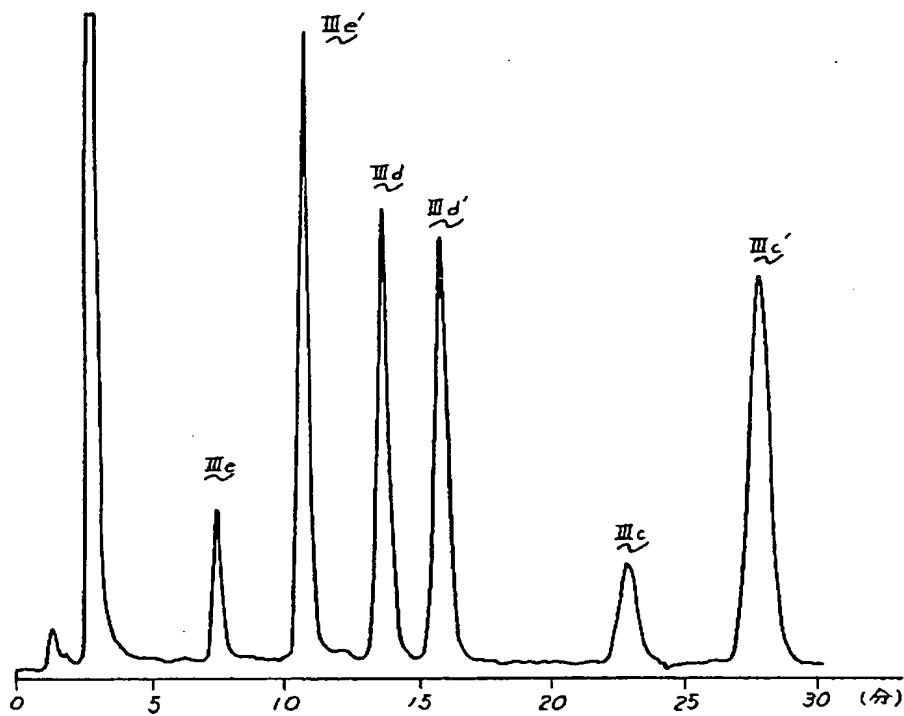
特許出願人 株式会社バイオセンサー研究所

代理人 律師 楊淺基三  
(外4名)

卷之三



第1図



## 第1頁の続き

⑤Int. Cl. <sup>5</sup>	識別記号	府内整理番号
C 07 D 403/12		8213-4C
405/06		8213-4C
405/12		8213-4C
413/06		8213-4C
413/12		8213-4C
471/04	1 1 2 T	8829-4C
491/056		7019-4C
G 01 N 31/22	1 2 2	9015-2G